

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Fakultet za odgojne i obrazovne znanosti

**MARINA ČOVIĆ**

**BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U LIŠĆU ISTARSKIH SORTA MASLINA**

Diplomski rad

Pula, studeni, 2016.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Fakultet za odgojne i obrazovne znanosti

**MARINA ČOVIĆ**

**BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U LIŠĆU ISTARSKIH SORTA MASLINA**

Diplomski rad

**JMBAG: 0303027945, redoviti student**

**Studijski smjer: Učiteljski studij**

**Predmet: Prirodoslovlje**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Znanstvena grana: Biologija**

**Mentor: doc.dr.sc. Mauro Štifanić**

**Komentor: dr.sc. Ines Kovačić**

Pula, studeni, 2016.



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Marina Čović, kandidat za magistra primarnog obrazovanja ovime izjavljujem da je ovaj Diplomski rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Diplomskog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student

---

U Puli, 10.11. 2016. godine



## **IZJAVA**

### **o korištenju autorskog djela**

Ja, Marina Čović dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrileu Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj diplomski rad pod nazivom Biološki aktivne tvari u lišću istarskih sorta maslina koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 10.11.2016

Potpis

---

## Sadržaj

1. Uvod.....	6
1.1 Maslina.....	8
1.1.1 <i>Od davnina između božanstva i simbolike</i> .....	8
1.1.2. <i>Opće osobine masline</i> .....	8
1.1.4. <i>Maslina i ulje u brojkama</i> .....	10
1.2. Masline u Istri .....	12
1.2.1. <i>Povijest maslinarstva Istre</i> .....	12
1.2.2. <i>Autohtone sorte maslina Istre</i> .....	12
1.3. Biološki aktivne tvari .....	17
1.3.1. <i>Fenolni spojevi</i> .....	17
1.3.2. <i>Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva</i> .....	19
1.4. Cilj istraživanja .....	21
2. Materijali i metode.....	22
2.1. Materijali .....	22
2.2. Metode.....	24
2.2.1. <i>Određivanje ukupnih fenola</i> .....	28
2.2.2. <i>Određivanje ukupnih neflavonoidnih fenola</i> .....	28
2.2.3. <i>Određivanje ukupnih flavonoida</i> .....	29
2.2.4. <i>Određivanje antioksidativnog kapaciteta</i> .....	30
2.2.5. <i>Statistička obrada podataka</i> .....	32
3. Rezultati.....	33
3.1. Ukupni fenoli.....	33
3.2. Ukupni flavonoidi.....	35
3.3. Ukupni neflavonoidni fenolni spojevi .....	37
3.4. Ukupna antioksidativna aktivnost FRAP metodom.....	39
3.5. Ukupna antioksidativna aktivnost ABTS metodom.....	41
4. Rasprava .....	43
5. Zaključak.....	48
6. Literatura.....	49
Sažetak .....	53
Summary.....	54

## 1. Uvod

Prema Miljković i sur. (2011:5): „Maslina je najdugovječnija među dugovječnima, najplemenitija među plemenitima, najpostojanija među postojanima, prati ljudskom rodu od njegova postanka do danas; prva je među stablima.“ U mnoštvu literature spominje se kako je maslina u prošlosti bila simbol mira, čistoće, svjetlosti, nade i sl. I u današnje vrijeme maslina je prihvaćena čak i od strane UN-a koji ju prihvaćaju kao svoj simbol. Hrvatska kao zemlja u mediteranskom području ima veoma pogodne uvjete za uzgoj maslina sve od Istre pa do Dubrovnika. (Miljković i sur., 2011)

Na početku ovog rada osvrnula sam se na prošlost masline i njezine opće osobine kao što su morfološka i fiziološka svojstva. Nakon toga sam ponešto rekla o maslinama u Istri te opisala tri sorte maslina koje su bitne u ovom radu, a to su Rosinjola, Buža i Istarska Bjelica.

U Centru za istraživanje materijala „Metris“ u Puli na biotehničkom odjelu imala sam prilike sudjelovati u istraživanju biološki aktivnim tvarima u lišću istarskih sorti maslina koje sam prethodno navela.

Biološki aktivne tvari mogu se definirati kao prirodni nenutritivni fiziološki aktivni sastojci hrane koji imaju određena funkcionalna svojstva u organizmu te djeluju kao pomoćna sredstva u sprječavanju i liječenju bolesti te poboljšavanju stanja organizma. Cilj ovog istraživanja je bio određivanje bioaktivnih supstancii antioksidativnog kapaciteta biljnih infuzija tri različite sorte istarskih maslina. Sva mjerenja obavljena su u laboratoriju. Najprije se pratio utjecaj gradacije listova koji su bili fino mljeveni, grubo mljeveni i cijeli te utjecaj vremena na proces ekstrakcije.

Mjerilo se najprije 5 minuta, zatim 15 minuta i na kraju 30 minuta. Od metoda upotrijebljene su kolorimetrijske i spektrofotometrijske metode. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uzorka s pripadajućim standardnim devijacijama. Grafovi su nacrtani u programu Microsoft Excel 2010 (Redmond, SAD). Dobiveni rezultati su izraženi kao prosječne vrijednosti tri mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. Statistička analiza podataka napravljena je upotrebom programa Statistica 10.0 (StatSoftInc., Tulsa, SAD).

Pomoću Multi-factor ANOVA analize varijance (engl. Analysis of variance ) izvršena je višestruka usporedba masenih koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta. Nakon toga, uslijedila je analiza one-way ANOVA, u kojoj je uspoređeno svaka gradacija listova u određenom vremenu prema pojedinim vrstama. Uslijed utvrđivanja homogenosti varijance (Leaven test  $> 0.05$ ), korišten je Tuckey test za usporedbu sorti. Ako homogenost varijance nije bila zadovoljena (Leaven test  $< 0.05$ ), korišten je Kruskal Wallis test. Statistički značajnim smatrane su razlike između uzoraka za koje je stupanj vjerojatnosti  $p \leq 0,05$ .

## **1.1 Maslina**

### *1.1.1 Od davnina između božanstva i simbolike*

Maslina je simbol Mediteranskog područja te karakterizira civilizaciju i krajolik tog područja još od drevnih vremena. Uz sve to pruža čovjeku nezamjenjive proizvode za prehranu i svakodnevni život.

Priča ove biljke je čudesan spoj legende i stvarnosti. Mitologija govori kako je božica Minerva odrezala iz zemlje prvu biljku masline koja je već imala plodove i cvjetove kada ju je na dvoboj izazvao Neptun. Od tada je maslina svima postala simbol mira. Uz to postoji i priča kako je Hanibal savjetovao Kartažanima da odu do Scipiona na brodu koji je bio ukrašen maslinama i sklope mir nakon Panskog rata. U srpnju 1969. godine kada su se američki astronauti spuštali na Mjesec postavili su pločicu s otisnutom maslinovom grančicom kao simbol mira i podsjetnik na tu misiju.

Kršćanska vjera također spominje maslinovu grančicu kao simbol završetka božanskog gnjeva prema čovjeku. Stari Rimljani su ukrašavali kipove maslinama u znak poštovanja. Maslina je bila i simbol nade u talijanskim selima. Tamo su se u pojedinim područjima bacali listovi masline u ognjište kako bi se sačuvala polja od tuče.

Maslina je bila i simbol pretkazanja nesreće i smrti. U misterioznim knjigama pisalo je da će maslinovo stablo pasti i ostaviti vidljive smrtne vrhove svojih grana kao znak izbijanja rata. (Del Fabro, 2015).

### *1.1.2. Opće osobine masline*

Iako maslina (*Olea europaea* L.) pripada suptropskim kulturama dobro se prilagodila klimi Mediterana. Ona je zimzelena biljka bujnog rasta koja doživi starost od više stotina godina, a ponekad i više od tisuću. (Družetić, 2014)

Korijen masline je razgranat i nalazi se na dubini od 15-80 cm. Funkcija mu je držanje i učvršćenje stabla, upijanje vode i minerala iz tla. Korijen se grana i raste do određene dubine ovisno o dubini tla i geološkoj podlozi. Panj je važan dio stabla koji



se razvija od vrata glavnih žila do 20-tak centimetara iznad površine. Na panju se formiraju „guke“ (okruglasta odebljanja) iz kojih izbijaju izdanci. Deblo je smješteno između panja i krošnje. Krivo je i kvrgasto, a kod mladih stabala kora na deblu je glatka i kasnije potamni i ispuca. Krošnja je kuglasta i piramidalnog, uspravnog ili visećeg oblika, ovisno o sorti. Čine je osnovne i sporedne grane, grančice i jednogodišnji izboji. Oblik se formira rezidbom iako je ponekad uvjetovan vjetrom i osobinom sorte. Za osobe koje uzgajaju masline važni su jednogodišnji izboji koji su se formirali prethodne godine, koji nose cvijet i plod. Listovi kod masline su raspoređeni nasuprotno. Duguljasto eliptična su oblika, sa kratkom lisnom peteljkom. Gornja strana lista je glatka te može biti svijetlozelene ili tamnozelene boje, a donja strana je kožasta i srebrnasto siva. Na maslini list ostane dvije do tri godine i ima funkciju asimilacije<sup>1</sup>, disimilacije<sup>2</sup> i transpiracije<sup>3</sup>. Na pokožici se nalazi sloj dlačica i mali otvori na pućima koji štite maslinu od suše. Pupovi su smješteni u pazušcu lista, na rubovima izboja i skriveni su na granama, panju i deblu. Nakon što završi zima maslina razvrstava pupove u cvjetne ili drvene. Cvjetovi su dvospolni, bijeli i udruženi su rese (uspravne grozdaste cvatove). Za formiranje cvjetnih pupova potrebne su niske temperature u siječnju i veljači (7 stupnjeva). Oprašivanje se vrši pomoću vjetra, pa raspored oprašivača treba prilagoditi smjeru vjetrova. Plod je bobica koštunica duga od jednog do tri centimetra. Sjajan je, točkast i loptasto-jajasta oblika. U početku je plod zelene boje, zatim postaje crvenkast, a kada dozrije dobije tamnomodru ili crnu boju. Maslina je poznata po odbačaju plodova, a to sve ovisi o vlazi u zemljištu, ishrani, utjecaju biljnih bolesti i štetnicima.

Rodnost masline ovisi o nizu fizioloških procesa koji se događaju u životu masline. U tome veliku važnost ima diferencijacija<sup>4</sup> pupova, oplodnja, cvatnja, odgoj i dozrijevanje plodova. Pri temperaturi od 5 stupnjeva Celzijusa maslina počinje vegetirati. U veljači pri temperaturi od oko 7 stupnjeva celzijusa počinje diferencijacija

---

<sup>1</sup> „Skup procesa izgradnje organskih spojeva iz anorganskih tvari.“ (Hrvatski jezični portal, pristupljeno 30.06.2016.)

<sup>2</sup> „Faza u izmjeni tvari u kojoj se složeniji organski spojevi organizma razrađuju u jednostavnije uz oslobađanje energije potrebne za rad.“ (Hrvatski jezični portal, pristupljeno 30.06.2016.)

<sup>3</sup> „Izlučivanje vode iz biljke u obliku vodene pare na površinama koje graniče s atmosferom.“ (i Enciklopedija.hr, pristupljeno 17.09.2016.)

<sup>4</sup> „Pojavljivanje morfoloških i funkcionalnih razlika tijekom embrionalnoga razvoja.“ (Hrvatski jezični portal, pristupljeno 30.06.2016.)

pupova. Izbijanje pupova i porast resa počinje pri temperaturi od oko 10 stupnjeva celzijusa. Taj period traje oko 2 mjeseca te nakon toga dolazi do cvatnje.

Cvatnja se odvija pri temperaturi 15-20 stupnjeva celzijusa i traje samo nekoliko dana. Hoće li maslina uspješno procvasti i oploditi se ovisi o blagom vjetru koji raznosi pelud i temperaturi, pa i o oprašivačima jer sve sorte maslina su drugačije samooplodne. Oplodnja i razvoj traju od 1. lipnja pa do 15. listopada. U našoj klimi u ovo vrijeme vladaju suše koje nepovoljno utječu na oplodnju i razvoj ploda. Zbog toga je potrebno vršiti navodnjavanje. Na kraju kolovoza i tokom rujna, plodovi se brže razvijaju jer završavaju ljetne vrućine i suše. Dozrijevanje plodova počinje u mjesecu listopadu, a berba se ponekad produži sve do mjeseca siječnja. (Večernik, 2003)

#### *1.1.3. Ljekovitost*

Plod masline, njezino ulje i lišće se koriste za prehrambene i zdravstvene svrhe. Posljednjih godina došlo je do velikog zanimanja za zdravstvene učinke različitih biljnih čajeva od kojih je najčešći čaj od masline. Populacija ljudi na području Mediterana ga koriste kako bi izliječili razne bolesti stoga je porastao interes znanstvenika za zdravstvene prednosti tog čaja.

Rezultati dobiveni testiranjem životinja podržavaju ideju da listovi masline blagotvorno djeluju na određena zdravstvena stanja, uključujući hipertenziju, kardiovaskularne bolesti, dijabetes i hiperlipidemiju. Ovi korisni učinci mogu biti zbog antioksidativnih sastojaka, pogotovo oleuropeina. Iako zdravstveni učinci lišća maslina su obećavajući, neke izazove kao što je potreba da se dobije bolje razumijevanje od mogućih interakcija između bioaktivnih komponenti i drugih prehrambenih sastojaka, ali i potrebe da se odredi najučinkovitija doza lišća kako bi se dobili korisni zdravstveni učinci. (Sedef, Karakaya, 2009)

#### *1.1.4. Maslina i ulje u brojkama*

Maslina uspijeva u umjerenim zonama koje su obuhvaćene između 46° stupnja sjeverne zemljopisne širine i 35° južne zemljopisne širine. Može biti uzgajana od razine mora do 600-700 metara nadmorske visine.

Može preživjeti na temperaturama između -6 i -8°C, ovisno o sorti. Na -7°C zračni dio te biljke može biti izložen opasnosti, a na -12°C nastaju teža oštećenja na maslinama. Na 9 milijuna i 500 tisuća hektara površine uzgaja se 800 milijuna biljaka koje proizvode oko 8 milijuna tona maslina u cijelom svijetu. Svjetska proizvodnja iznosi 2 milijuna i 400 tisuća tona maslinovog ulja. Najveći proizvođač je Španjolska, a nakon nje Italija. Na 9 milijuna hektara uzgaja se 700 milijuna biljaka koje proizvode milijun i petsto tisuća tona ulja na području Mediterana.

Od 0 do 5-7 godina nasad masline je neproduktivan; od 5-7 godina do oko 30 godina maslina raste sa stalnim povećanjem produktivnosti; od 35 do 150 godina doživljava punu zrelost i punu produktivnost; preko 150 godina počinje starenje sa visokom produktivnošću. Jedno stablo proizvede od 15 do 40 kilograma maslina (3-8 kilograma ulja), a jedna osoba u sat vremena može ubrati od 10 do 20 kilograma maslina.

Europski prosjek potrošnje ulja po stanovniku iznosi 4,3 kg/godina. (Vischiot, 2004.) Poznato je kako se masline pretežno koriste za proizvodnju ulja, ali plodovi masline su vrlo zdravi za jelo zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti (Tablica 1.).

Tablica 1. Sastav masline na 100 g ploda (USDA National Nutrient Database, 2003)

<b>Sastojak</b>	<b>Jedinica</b>	
Energija	kcal	145
Voda	g	75.28
Masti	g	15.32
Šećeri (ukupno)	g	0.54
Proteini	g	1.03
Kalcij	mg	52
Magnezij	mg	11
Vitamin C	mg	0.0
Natrij	mg	1556
Zasićene masne kiseline	g	2.029
Mononezasićene masne kiseline	g	11.314

Polinezasićene masne kiseline	g	1.307
----------------------------------	---	-------

Povijesno gledajući listovi masline također su imali vrlo važnu ulogu u liječenju. Korišteni su na području Mediterana tisućama godina kao narodni lijek. Lišće se oralno uzimalo za stomachne i crijevne bolesti, ali i kao sredstvo za čišćenje usta. Sušeni listovi uzimali su se oralno za sprječavanje dijareje i liječenje infekcija dišnog i mokraćnog sustava. (Mujić i sur., 2011)

## **1.2. Masline u Istri**

### *1.2.1. Povijest maslinarstva Istre*

Maslina je u Istri poznata više od 2 500 godina, a Grci su bili prvi narod koji je uzgajao maslinu na ovom području te su donijeli u ovaj kraj sorte koje su se uzgajale u Grčkoj. Od vremena Venecijanske republike u Istri postoje razne sorte maslina. Arheološke iskopine na području Pule i Brijuna svjedoče o preradi maslinovih plodova u Istri. U muzeju u Poreču čuva se nadgrobni spomenik na kojem je predstavljeno stablo masline s beračem maslinovih plodova, dok se u pulskoj areni čuvaju dijelovi stare rimske uljare.

Maslina je bila okosnica života istarskih poljoprivrednika te nikad nije bila odbačena iako je njezin razvojni put imao uspone, stagnacije, pa čak i nazadovanje u uzgoju. Istra je regija koja ima puno prikladnih položaja za uzgoj, razvoj, proširenje i unapređivanje maslinarstva. Zahvaljujući prikladnim površinama i primjenom najmodernije tehnologije omogućava se postizanje vrlo visokih rezultata za prvorazrednu kakvoću ulja. (Žužić, 2008).

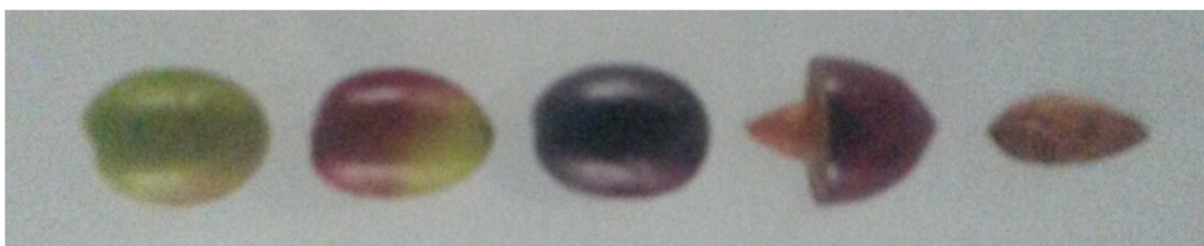
### *1.2.2. Autohtone sorte maslina Istre*

#### Rosinjola

Domaća je sorta najrasprostranjenija na području Rovinja. Rezidba se ne smije izostaviti zbog bujna rasta njezine krošnje. Listovi su svijetlozelene boje i ovalnog oblika sa zaobljenim vrhom. Za ovu sortu je karakteristično to što se plodovi na izbojima pojavljuju u grozdovima



Slika 1. Izgled lista Rosinjole (Šilović, 2012)



Slika 2. Izgled ploda Rosinjole (Šilović, 2012)

### Buža vodnjanska ženska

Ovo je domaća sorta koja je najviše zastupljena u vodnjanskim maslinicima. Stablo je bujna rasta i vrlo dobro podnosi rezidbu. Listovi su srednje veličine, svijetle maslinasto zelene boje. Plodovi su srednje veliki i najkrupniji u odnosu na ostale sorte. Plodovi su većinom okrugli, no poneki su srcolika oblika. Kada je plod zreo poprimi tamnoplavoljubičastu boju.



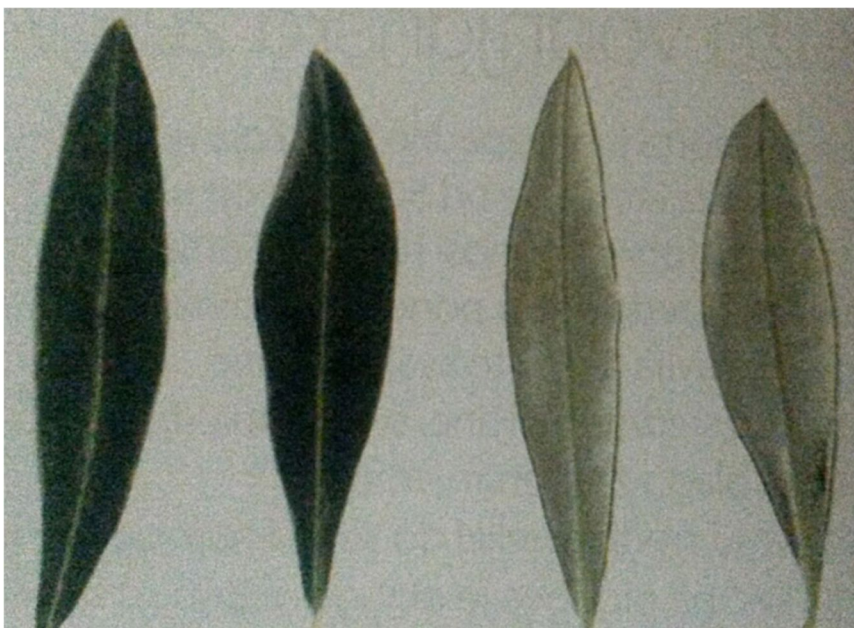
Slika 3. Izgled lista buže vodnjanske ženske (Šilović, 2012)



Slika 4. Izgled ploda buže vodnjanske ženske (Šilović, 2012)

#### Buža vodnjanska muška ili plominka

Ovo je domaća sorta južne Istre koja se najčešće nalazi pomiješana s bužom vodnjanskom ženskom. Rodnost ove sorte je obilna i redovita, stablo je bujnog uspravnog rasta, a krošnja je gusta rasta zbog čega zahtijeva čestu rezidbu. Plodovi mijenjaju boju i počinju sazrijevati nešto ranije od buže vodnjanske ženske.



Slika 5. Izgled lista buže vodnjanske muške (Šilović, 2012)



Slika 6. Izgled ploda Buže vodnjanske muške (Šilović, 2012)

#### Istarska Bjelica

Ova sorta rasprostranjena je u cijeloj Istri. Stablo je uspravnog rasta i srednje je bujno. Zbog te bujnosti neizostavna je redovita rezidba na rod. List imakarakterističan oblik elipse, spiralno savijen po dužnoj osi u obliku slova S. Boja ploda koji je zreo je žutozelena. Rodnost ove sorte je redovita i obilata, te dozrijeva kasnije od drugih sorti. (Šilović, 2012.)





Slika 7. Izgled lista Istarske Bjelice (Šilović, 2012)



Slika 8. Izgled ploda Istarske Bjelice (Šilović, 2012)



### 1.3. Biološki aktivne tvari

Sam naziv „biološki aktivna tvar“ se najčešće odnosi na spojeve koji nemaju nutritivnu vrijednost, ali imaju određen utjecaj na zdravlje. Biološki aktivne tvari možemo definirati kao prirodne nenutritivne fiziološki aktivne sastojke hrane koji imaju određena funkcionalna svojstva u organizmu. One djeluju kao pomoćna sredstva u sprječavanju i liječenju bolesti te poboljšavanju stanja organizma općenito.

Potječu iz biljnih i životinjskih izvora, a međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i funkciji u organizmu. Skupina biološki aktivnih tvari je vrlo velika i raznolika, a neki primjeri skupina biološki aktivnih tvari su: polifenoli, flavonoidi, klorofil, izotiocijanati, alkaloidi, steroli, karotenoidi i drugi. (Brahmi i sur., 2014).

Biološki aktivne tvari se dijele na nutritivne (vitamini, minerali, aminokiseline, masne kiseline, ugljikohidrati) i nenutritivne tvari.

#### 1.3.1. Fenolni spojevi

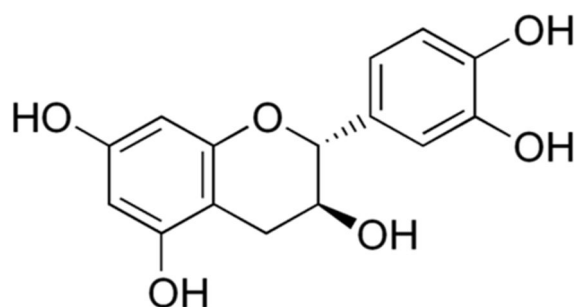
Fenol (karbolna kiselina),  $C_6H_5OH$  je bezbojni kristal posebna mirisa, koji se na zraku postupno oboji crveno. Proizvodi se iz katrana kamenoga ugljena i sintetski iz benzena. Koristio se kao prvi antiseptik u kirurgiji dok se danas koristi samo kao sredstvo za dezinfekciju materijala, za konzerviranje i sl. Važna je sirovina kod sinteza lijekova, boja, mirisa, eksploziva. (Hrvatski leksikon, pristupljeno 30.06.2016.)

Fenolni spojevi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998). Fenolne spojeve, u prirodi nalazimo i kao sekundarne biljne metabolite koji imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke, zaštiti protiv patogena i predatora (Bravo, 1998), te pridonose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća (Alasalvar i sur., 2001). Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na:

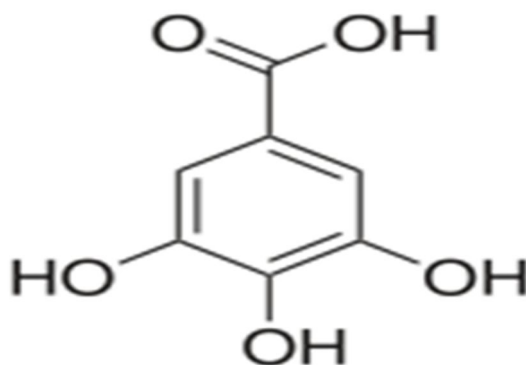
- 1) fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne);
- 2) flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani, itd.);
- 3) tanine (kondenzirani i hidrolizirani);
- 4) ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini.) (Naczki i Shahidi, 2006).

Za potrebe ovog rada fenolne ćemo spojeve podijeliti na flavonoide i neflavonoidne fenolne spojeve u koje spadaju i fenolne kiseline.

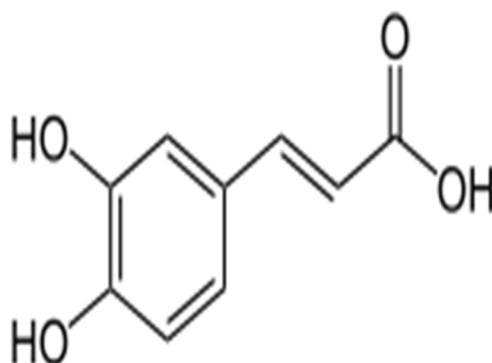
Predstavnik flavonoida je spoj zvan katehin dok su najpoznatije fenolne kiseline galna i kavena kiselina.



Slika 9. Katehin (preuzeto sa: <http://www.wikiwand.com/sr/Katehin> )



Slika 10. Galna kiselina (preuzeto sa: <http://www.wikiwand.com/bs/Tanin> )



Slika 11. Kavena kiselina (preuzeto sa: [https://bib.irb.hr/datoteka/773932.5.11.2015.FG\\_10-2015\\_-\\_Znanstveni\\_rad.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/773932.5.11.2015.FG_10-2015_-_Znanstveni_rad.pdf) )

Flavonoidi su spojevi koji se sastoje od točno dva fenilna prstena i heterocikličkog prstena. (preuzeto sa [http://www.agtcbioproducts.com/index.php?cPath=1327\\_1343](http://www.agtcbioproducts.com/index.php?cPath=1327_1343)) „Nalaze se u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Naravno da i velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost. Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a znatno utječu na boju i okus hrane. U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti, odbijanje od prehrane i za zaštitu od UV zračenja. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida. Očito su to spojevi koji imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a došavši u njih putem hrane, imaju sličnu ulogu i za druga živa bića. „ (Kazazić, 2004)

Sadržaj fenolnih spojeva u maslinama ovisi o brojnim faktorima kao što su porijeklo, vrsta masline, načini skladištenja, klimatski uvjeti, stupanj zagađenosti tla i sl.

### *1.3.2. Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva*

Antioksidansi su molekule koje sprječavaju oksidaciju drugih molekula. Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj se odvija transfer elektrona sa određene tvari na oksidant. Prilikom oksidacije mogu nastati slobodni radikali.

„Slobodni radikali jesu visokoreaktivni molekularni fragmenti koji imaju jedan ili više nesparen elektron. Mogu nastati fotolizom ili pirolizom kada se prekine veza bez stvaranja iona. Slobodni radikali sudjeluju kao inicijatori ili intermedijeri u reakcijama oksidacije, fotolize i polimerizacije.“

(preuzeto sa : <http://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=slobodni+radikal> )

Vrlo su kemijski nestabilni te budući da teže stabilnoj elektronskoj konfiguraciji mogu uzrokovati lančane reakcije oksidacije nukleinskih kiselina, proteina i lipida<sup>5</sup>.

Slobodni radikali nastaju svakodnevno u organizmu tijekom procesa dobivanja energije u stanicama te su bitni za opskrbu energijom, detoksikaciju, kemijsku signalizaciju i imunološke funkcije. U organizmu su prisutni u niskim koncentracijama ( $10^{-5}$ - $10^{-9}$ mol).

---

<sup>5</sup> „Organski spojevi masti, razne vrste voska, fosfatidi, karotenoidi i dr., otopivi u otapalima za masnoće, a netopivi u vodi“ (Hrvatski jezični portal, pristupljeno 30.06.2016.)

Problem nastaje kada u organizmu dođe do narušavanja ravnoteže prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa te se to naziva nazivamo oksidacijskim stresom. Do njega dolazi pucanjem veza unutar molekula u stanicama našeg organizma pod utjecajem loših životnih navika (poput pušenja, prekomjernog konzumiranja namirnica životinjskog porijekla, suhomesnatih proizvoda, pohane i pržene hrane, alkohola i sl.) i/ili kao rezultat vanjskih čimbenika (poput izloženosti stresu, pretjeranog izlaganja suncu, pretjeranog fizičkog napora, zagađenog zraka i sl.). Kod oksidacijskog stresa dolazi do oštećenja DNK, proteina i lipida stanične membrane. Oštećenje DNK uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji. (<http://www.irb.hr/Istrazivanja/Zavodi/Zavod-za-molekularnu-medicinu/Laboratorij-za-oksidacijski-stres>). Posljedice oksidacijskog stresa su mnogobrojne, a neke od njih su starenje, bolesti kardiovaskularnog sustava, oslabljene funkcije moždanog sustava, imunološkog sustava organizma, pa čak i razvoj tumora.

Antioksidansi preuzimaju obrambenu funkciju u organizmu: ponašaju se kao reducensi te otpuštaju elektrone kako bi zaustavili (lančane) reakcije slobodnih radikala te spriječili daljnje oksidacije.

Različite skupine fenolnih spojeva imaju vrlo izražena antioksidacijska svojstva te važnu ulogu u prevenciji i/ili razvoju različitih bolesti uzrokovanih djelovanjem slobodnih radikala. O kemijskoj strukturi fenolnih spojeva značajno ovisi njihova antioksidacijska aktivnost i sposobnost saniranja ili prevencije djelovanja slobodnih radikala. Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina u odnosu na karboksilnu funkcionalnu skupinu (Rice-Evans i sur., 1996; Robards i sur., 1999).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se različite metode kao što su:

- Radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS+ metoda)-U ovoj metodi prati se raspadanje ABTS. U odsutstvu fenolnih tvari, ABTS je relativno stabilan, ali brzo reagira u prisutstvu donora H te prelazi u neobojeni oblik ABTS-a. (Arnao i sur., 2001.).

- Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP metoda)– Metoda se temelji na redukciji  $\text{Fe}^3$  iona u  $\text{Fe}^2$  ion u prisutnosti antioksidansa. Nastali  $\text{Fe}^2$  ion formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 593 nm.

DPPH metoda je metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Kod DPPH testa ,uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije pri 517 nm, a do toga dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa. (Brand-Williams i sur., 1995.)

#### **1.4. Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja je kvantitativno određivanje bioaktivnih supstanci (ukupni fenoli, ukupni flavonoidi i ukupni neflavonoidi) i antioksidativnog kapaciteta vodeni ekstrakt tri različite sorte istarskih maslina (Rosinjola, Buža i Istarska Bjelica).

Tokom cijelog istraživanja pratio se utjecaj gradacije listova (fino mljeveni, grubo mljeveni i cijeli) i utjecaj vremena na proces ekstrakcije.

## 2. Materijali i metode

### 2.1. Materijali

U istraživanju su korišteni listovi istarskih sorti maslina: Rosinjola, Buža i Istarska Bjelica koji su ubrani u srpnju 2015. godine na području Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču. Nakon branja, uzorci su pakirani u papirnate vrećice, te dopremljeni u laboratorij u Centru za istraživanje materijala „Metris“ u Puli. Korištene su i različite kemikalije prilikom određivanja ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoidnih fenola koje možete pročitati u nastavku.

#### Kemikalije

Ukupni fenoli:

Folin-Ciocalteu reagens (Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka).

Ukupni neflavonoidi:

0,5 ml otopine kloridne kiseline (1:4) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i 0,5 mL formaldehida (T.T.T. doo, Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Ukupni flavonoidi:

$\text{AlCl}_3$  (Acros Organics, Geel, Belgija),  $\text{NaNO}_2$  (Acros Organics, Geel, Belgija),  $\text{NaOH}$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

:FRAP:

99% 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (Acros Organics, Geel, Belgija), 98% željezo (III) klorid heksahidrat, krist. (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka), 36,5% min. klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska),  $\geq 99,8\%$  bezv. octena kiselina (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka), 99+% natrij acetat trihidrat (Acros Organics, Geel, Belgija).

ABTS:

Etanol (96 %) (GRAM-MOL doo, Zagreb, Hrvatska), kalijev - peroksodisulfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) (Acros Organics, Geel, Belgija), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-

sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS) ( PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Njemačka)

Sva mjerenja provedena su na spektrofotometru UV–Vis NanoPhotometer P300 (Implen GmbH, München, Germany).

## 2.2. Metode

Listovi svake sorte usitnjeni su električnom sjeckalicom tako da je svaka sorta imala cijele listove (Slika 13. a, Slika 14. a i Slika 15. a ), grubo mljevene listove (Slika 13. b, Slika 14. b i Slika 15. b) i fino mljevene listove ( Slika 13. c, Slika 14. c i Slika 15. c).



Slika 12. Cjeloviti listovi (a), grubo mljeveni (b) i sitno mljeveni listovi Rosinjole (vlastiti izvor)



Slika 13. Cjeloviti listovi (a), grubo mljeveni (b) i sitno mljeveni listovi Buže (vlastiti izvor)

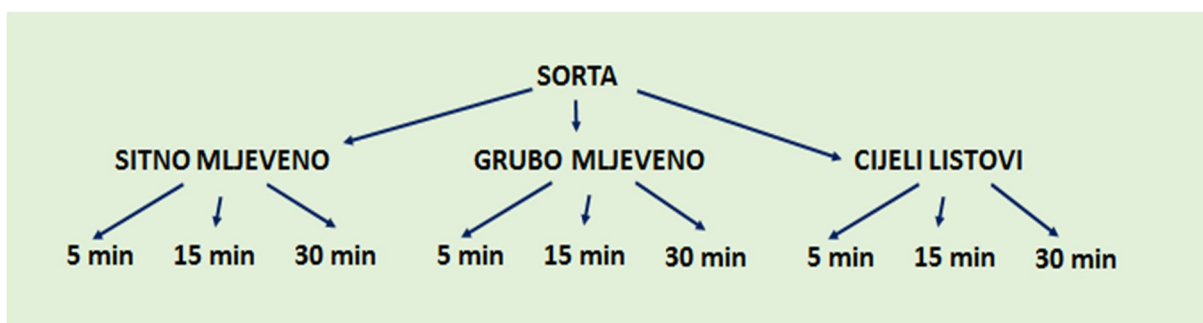




Slika 14. Cjeloviti listovi (a), grubo mljeveni (b) i sitno mljeveni listovi Istarske Bjelice (vlastiti izvor)

#### Priprema biljnih ekstrakata

Biljni ekstrakti pripremljeni su tako da je 1,5 g suhih (sušeni na zraku do konstantne mase) cijelih, grubo usitnjenih i fino usitnjenih listova 3 različite sorte maslina (Rosinjola, Buža i Istarska Bjelica) preliveno je sa 150 ml destilirane vode temperature 100°C. Ekstrakcija je trajala 5 min., 15 min. i 30 min. nakon čega su dobiveni ekstrakti procijeđeni kroz Munktell filter papir 21/N (80g/qm).



Slika 15. Način pripreme biljnih infuzija (vlastiti izvor)

#### Postupak određivanja ukupnih fenola:

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 0,1 mL uzorka, 7,9 mL destilirane vode te 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa, promiješa i nakon 3 min doda 1,5 mL 20%-tne otopine natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Sadržaj tikvice se zatim ponovno dobro promiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu.

Postupak određivanja ukupnih ne flavonida:

U Eppice od 2 mL otpipetira se 1 mL uzorka, 0,5 mL otopine kloridne kiseline (1:4) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i 0,5 mL formaldehida (T.T.T. doo, Sveta Nedjelja, Hrvatska) te se otopina propuše plinovitim dušikom i ostavi stajati 24 sata na mračnom i hladnom mjestu, nakon čega se u tako pripremljenoj otopini odredi udjel ukupnih ne flavonida, i to prema prethodno opisanom postupku određivanja ukupnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom.

Postupak određivanja ukupnih flavonoida:

U 0,5 mL uzorka doda se 2,2 mL destilirane vode te se doda 0,15 mL 5%  $\text{NaNO}_2$  otopine. Dobro se promiješa sadržaj, čeka se 6 min te se dodaje 0,15 mL 10%  $\text{AlCl}_3$  otopine. Zatim se opet sadržaj miješa i nakon 6 min se dodaje 2 mL 4%  $\text{NaOH}$  otopine. Sadržaj se miješa te se nakon 15 min određuje apsorbancija na 510 nm u odnosu na slijepu probu.

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom:

Za pripravu 500 mL acetatnog pufera koncentracije 300 mM potrebno je otopiti 1,55 g natrijeva acetata  $\times 3\text{H}_2\text{O}$  u vodi i dodati 8 mL koncentrirane octene kiseline. Osim toga je potrebno pripremiti 10 mM otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) otapanjem u 40 mM otopini kloridne kiseline, i 20 mM vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ).

FRAP reagens priprema se miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , tako da omjer dodanih otopina bude 10 :1 :1.

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom:

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka pripremi se otopina ABTS+ radikala, oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 mM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88  $\mu\text{L}$  140 mM otopine kalijevog peroksodisulfata te nadopuniti sa 7 mM otopinom ABTS reagensa do volumena od 5 mL. Budući da ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5 neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (min. 12-16 h) na

sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1%, tako da apsorbancija te otopine iznosi  $0,70 \pm 0,02$ .

Alikvot od 20  $\mu$ L uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS+ radikala u kiveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minute. Prije mjerenja uzoraka, potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka 20  $\mu$ L vode pomiješa s istom količinom reagensa (2 mL otopine ABTS+ radikala).

Za određivanje biološki aktivnih spojeva u prikupljenim uzorcima (ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih neflavonoida) upotrebljene su kolorimetrijske i spektrofotometrijske metode.

Kolorimetrija je kvantitativna analitička metoda za određivanje koncentracije tvari mjerenjem jačine boje otopine. (Kemijski rječnik , pristupljeno 30.06.2016.)

Spektrofotometrija je način određivanja koncentracije materijala u uzorku mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao. (Kemijski rječnik, pristupljeno 30.06.2016.)

„Apsorbancija je veličina koja iskazuje udio apsorbiranog elektromagnetskog zračenja u otopini.“ (<http://struna.ihj.hr/naziv/apsorbancija/10491/>)

„Baždarni dijagram je dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije otopine molekula u koncentraciji ili količini molekula u otopini. „ (Strelec, Kovač, 2013)

Pri određivanju ukupnih fenola očitavanje apsorbancije (A) proporcionalno je intenzitetu proizašle plave boje i koncentraciji ukupnih fenola (c). Kao standard najčešće se koristi galna kiselina. Iz baždarne krivulje (dijagrama) A vs. C (mg/L galne kiseline) konstruirane za standard određuje se koncentracija ukupnih fenola za nepoznate uzorke i izražava u ekvivalentima galne kiseline, GAE.

Pri određivanju ukupnih flavonoida apsorbancija se mjerila pri 510 nm, a kao standard se koristi katehin. Iz baždarne krivulje A vs. c (mg/L katehina konstruirane za standard određuje se koncentracija ukupnih flavonoida za nepoznate uzorke i izražava u ekvivalentima katehina, CE.

### 2.2.1. Određivanje ukupnih fenola

*Folin-Ciocalteu* metoda najčešće je primjenjivana metoda za određivanje ukupnih fenola u vinima, voćnim sokovima i prerađevinama te ekstraktima čajeva, kakao-proizvodima i kavi. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji *Folin-Ciocalteu* reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). *Folin-Ciocalteu* reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid-ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a *Folin-Ciocalteu* reagens reducira do plavo obojenih volframova i molibdenova oksida (Singleton i sur., 1999).

Nakon dva sata reakcije u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s *Folin-Ciocalteu* reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja mjerenjem apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 765 nanometra(nm) (Ough i Amerine, 1988).



Slika 16. Uzorci pripremljeni za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola. Veća koncentracija fenola- jače plavo obojenje (vlastiti izvor)

### 2.2.2. Određivanje ukupnih neflavonoidnih fenola

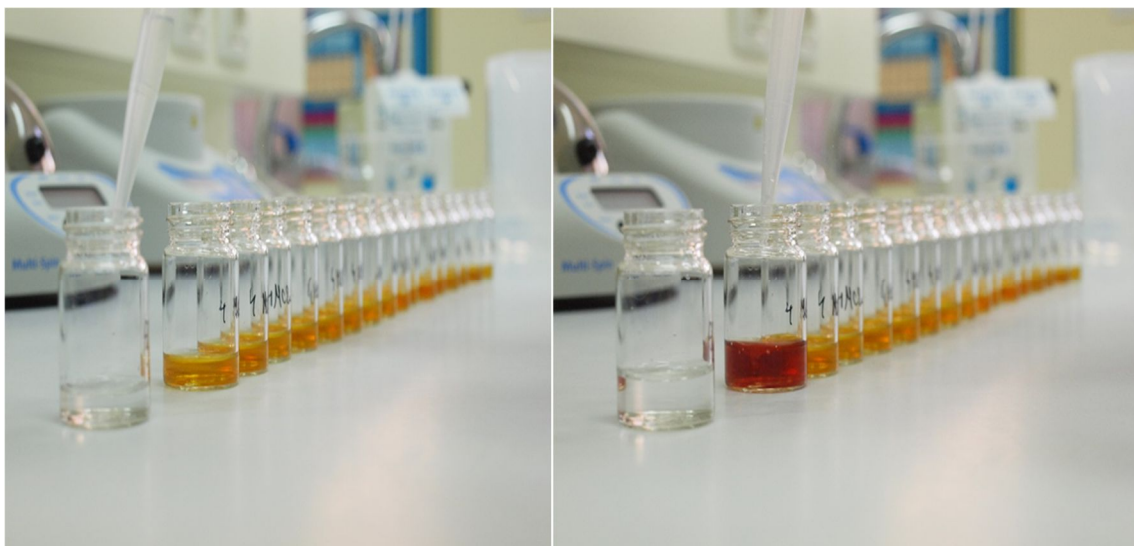
Svi neflavonoidni fenoli određuje se prema metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988), opisanoj u poglavlju 2.2.1..



*Slika 17. Uzorci pripremljeni za spektrofometrijsko određivanje koncentracije ukupnih neflavonoidnih fenola. Veća koncentracija neflavonoidnih fenola-jače plavo obojenje (vlastiti izvor)*

### *2.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida*

Ukupni flavonoidi se određuju kolorimetrijskom metodom s aluminijevim kloridom. U alkalnoj sredini dodatak aluminijeva klorida uzorku uzrokuje crveno obojenje (Zhishen i sur., 1999) koje je proporcionalno koncentraciji flavonoida. Apsorbancija se mjeri pri 510 nm, a kao standard se najčešće koristi katehin. Usporedbom rezultata mjerenja s baždarnom krivuljom konstruiranom za standard(mg/L katehina), određuje se koncentracija ukupnih flavonoida za nepoznate uzorke i izražava u ekvivalentima katehina, CE (od engl. Catechin Equivalent).



*Slika 18. Završna faza pripreme uzoraka za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida. Dodatkom aluminij-klorida uzorci mijenjaju boju čiji intenzitet ovisi o koncentraciji ukupnih flavonoida u uzorku.*

#### *2.2.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta*

Ukupni antioksidativni kapacitet hrane pokazuje koliko antioksidansi (prethodno analizirane biološki aktivne tvari poput fenola) u nekoj hrani mogu uništiti slobodnih radikala.

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta postoje različite metode. Najčešće se koriste Trolox ekvivalent metode (TEAC-*Trolox equivalent antioxidant capacity*), te FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) metoda. U analizama provedenim u laboratoriju METRIS-a korištene su TEAC metoda - ABTS te FRAP metoda.

ABTS metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a u ovom istraživanju koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije. Stoga se udjel ABTS radikala koje „gase“ različiti antioksidansi izražava kao funkcija koncentracije i vremena, i mjeri praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-



tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).



*Slika 19. Uzorci pripremljeni za oksidaciju otopine ABTS-a uz otopinu kalijevog persulfata.. Veći antioksidativni kapacitet=manje zeleno obojenje jer se uništava radikal (vlastiti izvor)*

FRAP metoda temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) u fero formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 593 nm.



*Slika 20. Određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka spektrofometrijskim mjerenjem apsorbancije Veći antioksidativni kapacitet=jače plavo obojenje (vlastiti izvor)*

#### *2.2.5. Statistička obrada podataka*

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uzorka s pripadajućim standardnim devijacijama. Grafovi su nacrtani u programu Microsoft Excel 2010 (Redmond, SAD). Dobiveni su rezultati izraženi kao prosječne vrijednosti tri mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

Statistička analiza podataka i korelacija između parametara napravljena je u programu Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD).

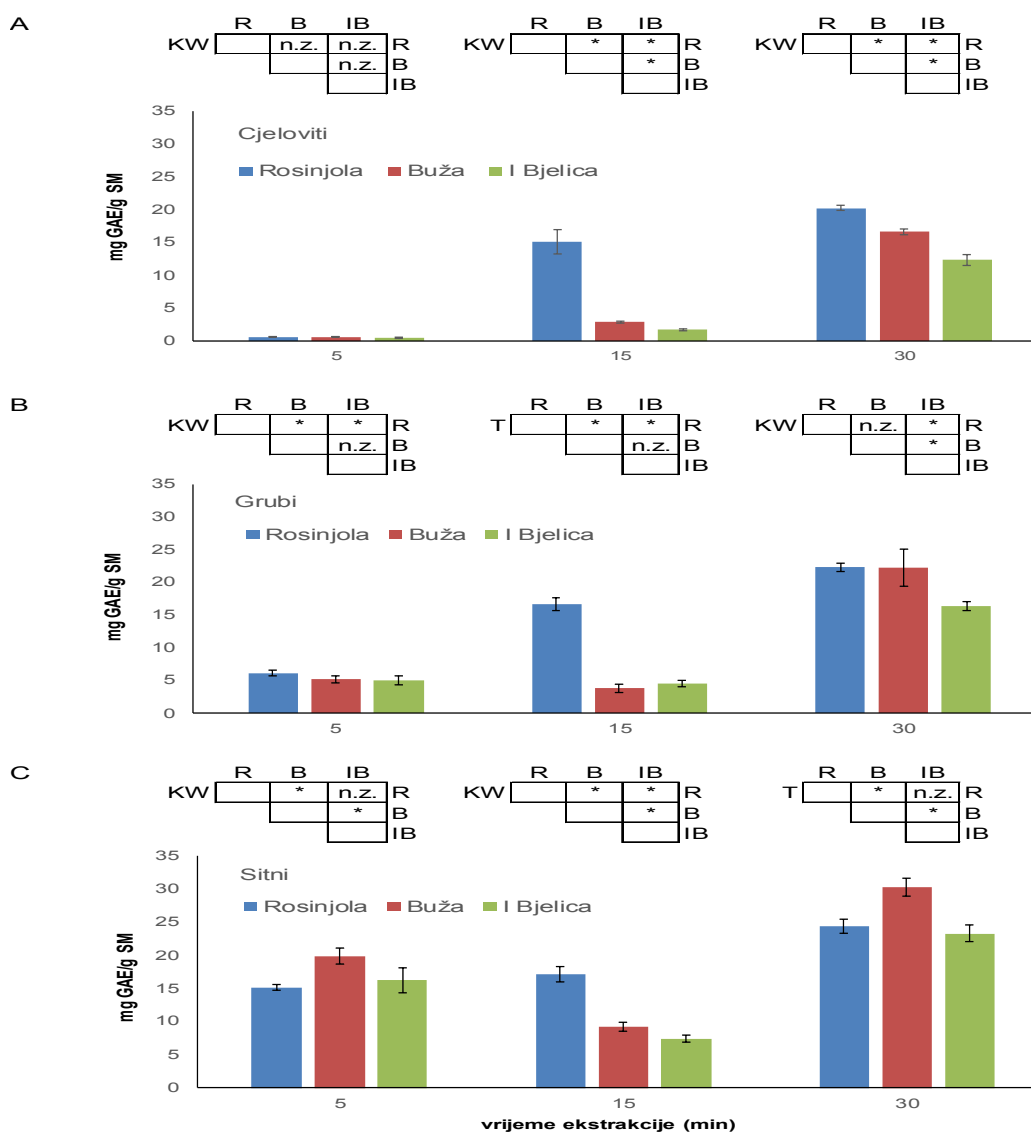
Pomoću Multi-factor ANOVA analize varijance (engl. Analysis of variance ) izvršena je višestruka usporedba masenih koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta. Nakon toga, uslijedila je analiza one-way ANOVA, u kojoj je uspoređeno svaka gradacija listova u određenom vremenu prema pojedinim vrstama. Uslijed utvrđivanja homogenosti varijance (Leaven test  $> 0.05$ ), korišten je Tuckey test za usporedbu sorti. Ako homogenost varijance nije bila zadovoljena (Leaven test  $< 0.05$ ), korišten je Kruskal Wallis test. Statistički značajnim smatrane su razlike između uzoraka za koje je stupanj vjerojatnosti  $p \leq 0,05$ .



### 3. Rezultati

#### 3.1. Ukupni fenoli

Slika 21. prikazuje masenu koncentraciju ukupnih fenola (mg GAE/100 g suhe tvari) u vodenim ekstraktima cjelovitog (A), grubo mljevenog B) i sitno mljevenog (C) lišća istarskih sorti maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (IB) nakon 5, 15 i 30 minuta ekstrakcije. Rezultati su srednje vrijednosti 3 paralelna određivanja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistički značajna razlika (\*) određena je Tuckey testom (T) ili Kruskal-Wallis testom (KW) na razini značajnosti  $p < 0,05$ . Ako nije postignuta statistički značajna razlika, u tablici je navedeno "n.z."

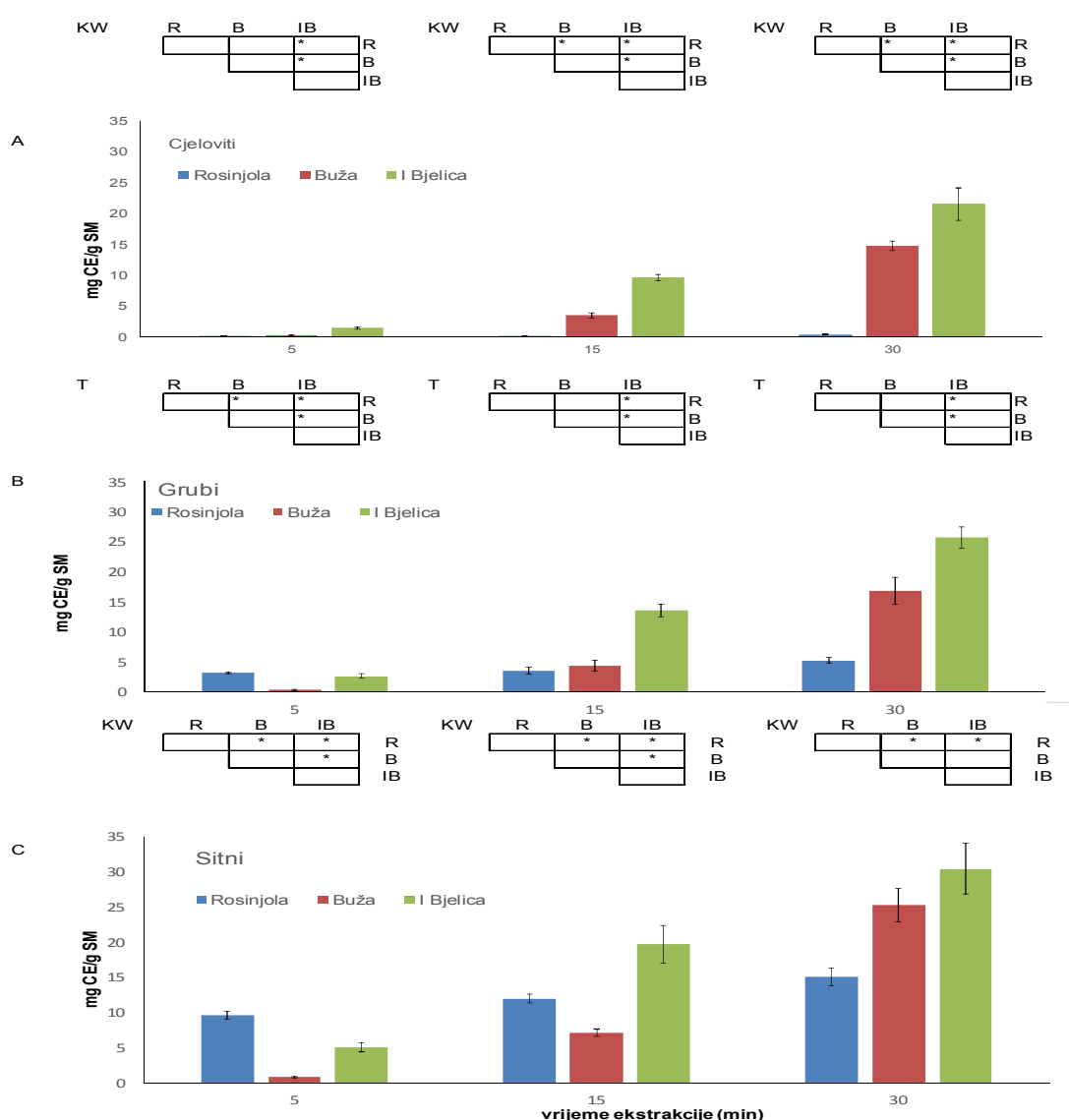


Slika 21. Ukupni fenoli u infuzijama lišća maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (I Bjelica, IB).

Na slici 21. dobiveni rezultati pokazuju kako sorta Rosinjola ima najveću masenu koncentraciju ukupnih fenola kod grubih i cijelih listova. Vrijeme ekstrakcije se pokazalo vrlo bitno jer se po rezultatima može primjetiti kako je najmanja koncentracija fenola dobivena u vremenu od 5 minuta, dok je najveća koncentracija dobivena pri vremenu od 30 minuta. U vremenu od 5 minuta koncentracije između ove tri sorte su podjednake pa nema velikih razlika u koncentracijama. Vrlo bitna se pokazala i usitnjenost listova te su tako rezultati pokazali da su najmanje koncentracije kod cjelovitih listova, a najveće kod usitnjenih listova. Najveća odstupanja između sorti su kod grubih listova u vremenu od 15 minuta gdje sorta Rosinjola ima  $16,62 \pm 0,93$  mg GAE/ g suhe tvari, Buža  $3,82 \pm 0,66$  mg GAE/ g suhe tvari, a Istarska Bjelica  $4,49 \pm 0,50$ . Najveću koncentraciju ukupnih fenola ima Buža gdje je u vremenu od 30 minuta kod usitnjenih listova koncentracija iznosila  $30,28 \pm 1,37$ . Najmanju koncentraciju imala je Istarska Bjelica koja je u vremenu od 5 minuta u cijelim listovima imala koncentraciju od  $0,45 \pm 0,05$ .

### 3.2. Ukupni flavonoidi

Slika prikazuje je masenu koncentraciju ukupnih flavonoida (mg CE/g suhe tvari) u vodenim ekstraktima cjelovitog (A), grubo mljevenog B) i sitno mljevenog (C) lišća istarskih sorti maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (IB) nakon 5, 15 i 30 minuta ekstrakcije. Rezultati su srednje vrijednosti 3 paralelna određivanja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistički značajna razlika (\*) određena je Tuckey testom (T) ili Kruskal-Wallis testom (KW) na razini značajnosti  $p < 0,05$ . Ako nije postignuta statistički značajna razlika, u tablici je navedeno "n.z."

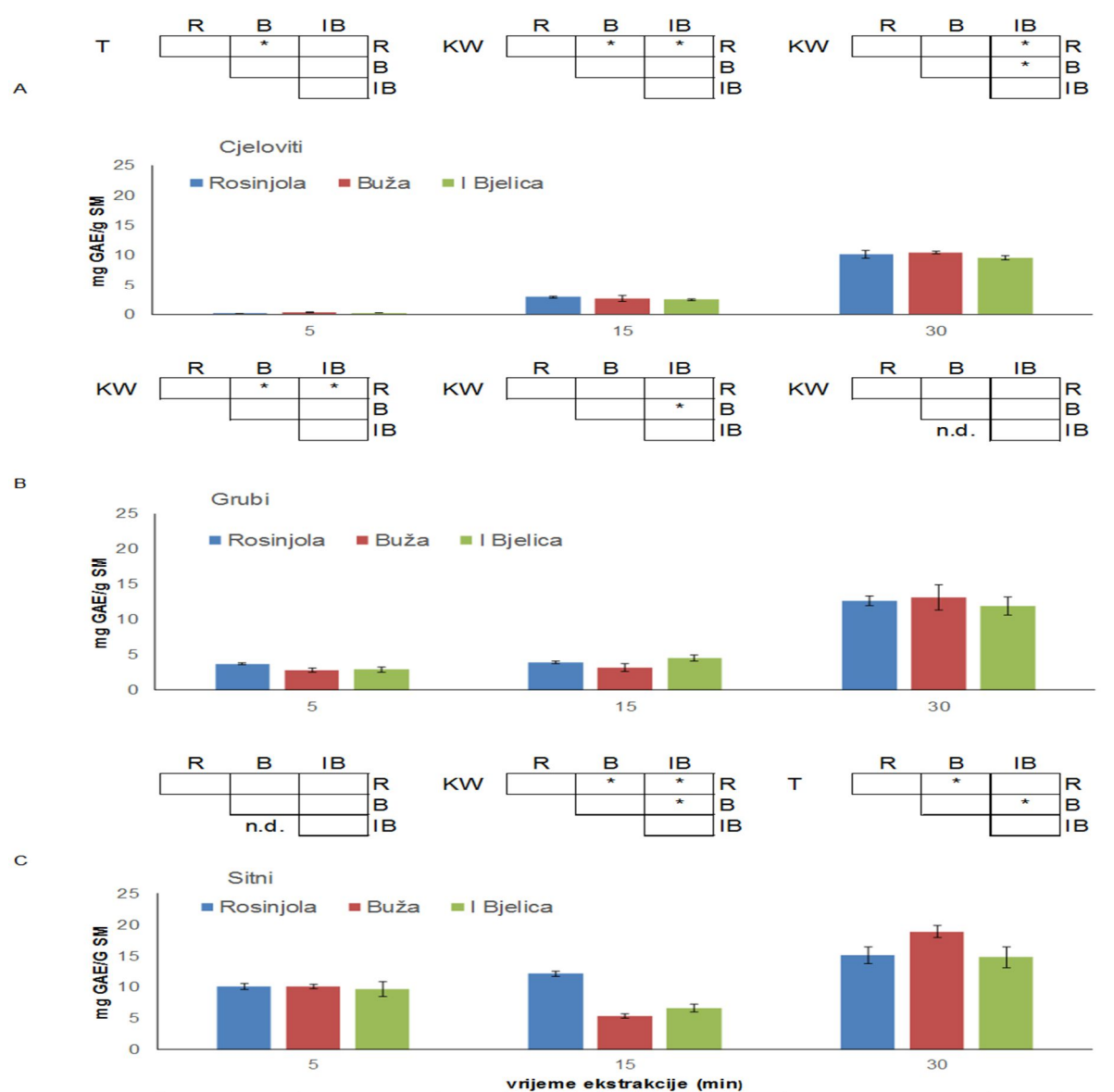


Slika 22. Ukupni flavonoidi u infuzijama lišća maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (I Bjelica, IB).

Na slici 22. dobiveni rezultati pokazuju kako je vrlo bitno vrijeme ekstrakcije kao i usitnjenost lista. Što je list sitniji ukupna koncentracija flavonoida je veća. Isto tako što je vrijeme ekstrakcije dulje, veća je koncentracija. Značajnijih razlika između sorti nema. Najmanju koncentraciju imala je sorta Rosinjola gdje je kod cijelih listova u vremenu od 5 minuta koncentracija iznosila  $0,15 \pm 0,02$ , dok je kod Istarske Bjelice iznosila  $1,44 \pm 0,17$ . Veliko odstupanje u koncentraciji između sorti je kod cijelih listova u vremenu od 30 minuta, te je tako Rosinjola imala ukupnu koncentraciju od  $0,36 \pm 0,05$  mg CE/g suhe tvari, a Istarska Bjelica  $21,57 \pm 2,64$  mg CE/g suhe tvari. Najveću ukupnu koncentraciju imala je Istarska Bjelica te je kod usitnjenih listova u vremenu od 30 minuta koncentracija iznosila  $30,34 \pm 3,65$  mg CE/g suhe tvari

### 3.3. Ukupni neflavonoidni fenolni spojevi

Slika prikazuje masenu koncentraciju ukupnih neflavonoida (mg GAE/g suhe tvari) u vodenim ekstraktima cjelovitog (A), grubo mljevenog B) i sitno mljevenog (C) lišća istarskih sorti maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (IB) nakon 5, 15 i 30 minuta ekstrakcije. Rezultati su srednje vrijednosti 3 paralelna određivanja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistički značajna razlika (\*) određena je Tuckey testom (T) ili Kruskal-Wallis testom (KW) na razini značajnosti  $p < 0,05$ . Ako nije postignuta statistički značajna razlika, u tablici je navedeno "n.z.".

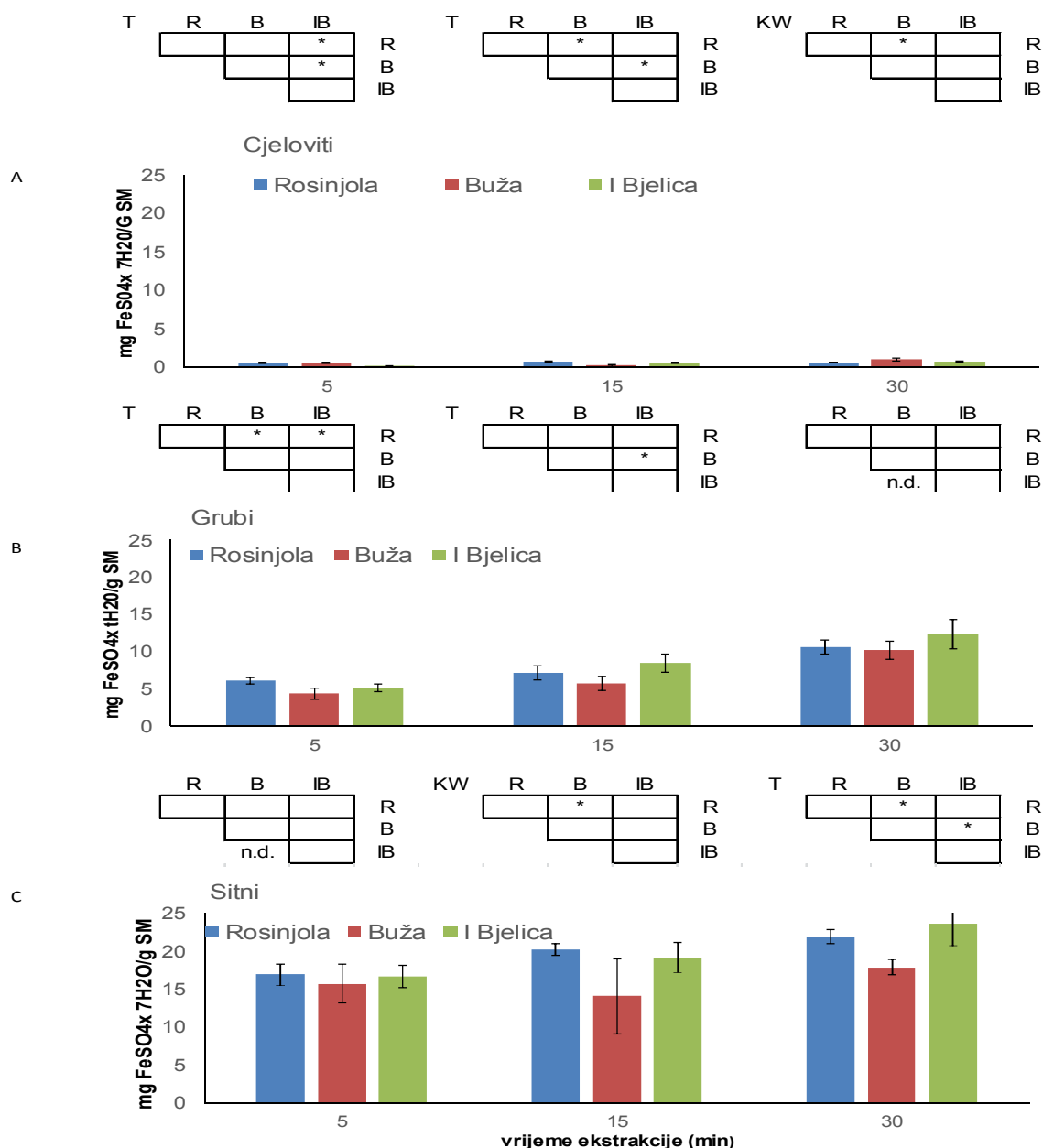


Slika 23. Ukupni neflavonoidni fenoli u infuzijama lišća maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (I Bjelica, IB).

Na slici 23. rezultati pokazuju da je podjednako važno vrijeme ekstrakcije i usitnjenost listova. Najmanja koncentracija ukupnih neflavonoidnih fenola dobivena je u vremenu od 5 minuta kod cijelih listova, dok je najveća koncentracija dobivena kod usitnjenih listova u vremenu od 30 minuta. Nema značajnijih odstupanja između ove tri sorte maslina. Najveće odstupanje dobiveno je kod cijelih listova u vremenu od 30 minuta gdje je sorta Rosinjola imala koncentraciju od  $0,36 \pm 0,05$  mg GAE/g suhe tvari, Buža  $14,78 \pm 0,76$  mg GAE/g suhe tvari, a najveću je imala Istarska Bjelica čija je koncentracija iznosila  $21,57 \pm 2,64$  mg GAE/g suhe tvari. Najveća koncentracija neflavonoidnih fenola iznosila je  $30,34 \pm 3,65$  mg GAE/g suhe tvari kod Istarske Bjelice u vremenu od 30 minuta i usitnjenih listova.

### 3.4. Ukupna antioksidativna aktivnost FRAP metodom

Na slici 24. prikazana je masena koncentracija antioksidativne aktivnosti ukupno FRAP metodom (mM TE/g suhe tvari) u vodenim ekstraktima cjelovitog (A), grubo mljevenog B) i sitno mljevenog (C) lišća istarskih sorti maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (IB). Rezultati su srednje vrijednosti 3 paralelna određivanja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistički značajna razlika (\*) određena je Tuckey testom (T) ili Kruskal-Wallis testom (KW) na razini značajnosti  $p < 0,05$ . Ako nije postignuta statistički značajna razlika, u tablici je navedeno "n.z.".



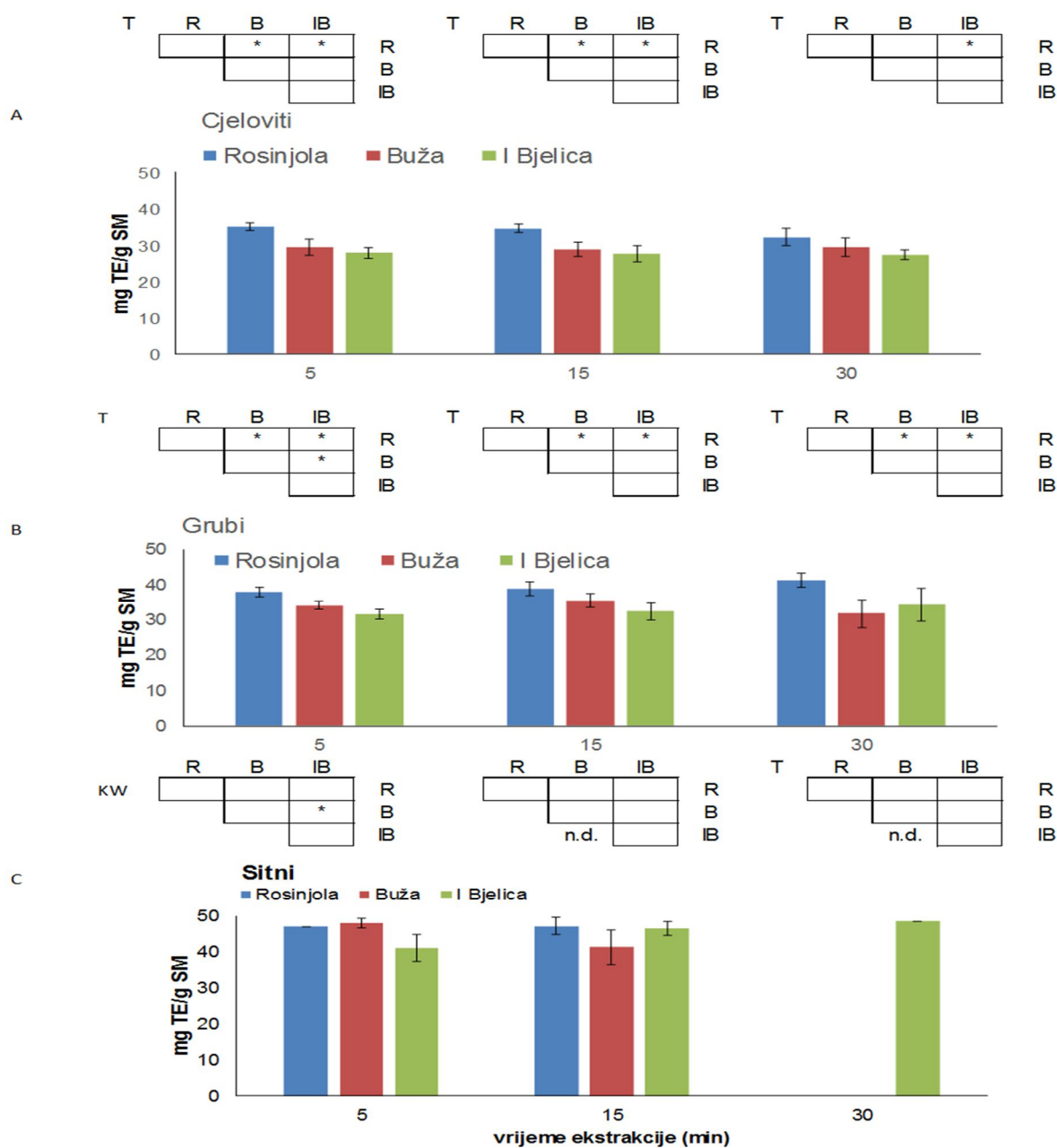
Slika 24. Ukupna antioksidativna aktivnost dobivena FRAP metodomu infuzijama lišća maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (I Bjelica, IB).

Rezultati antioksidativne aktivnosti pokazuju da je i u ovom slučaju najmanja antioksidativna aktivnost bila pri vremenu od 5, a najviša u vremenu od 30 minuta. Po tome zaključujemo da što je više vremena prošlo, veća je i antioksidativna aktivnosti. Nema većih razlika među ove tri sorte. Značajna je bila i usitnjenost listova te rezultati pokazuju da što su listovi usitnjeniji veća je i antioksidativna aktivnost. Npr. Pri vremenu od 5 minuta kod cijelih listova Rosinjola je imala antioksidativnu aktivnost od  $0,56 \pm 0,07$  mM TE/g suhe tvari , dok je kod usitnjenih listova pri vremenu od 30 minuta iznosila  $21,93 \pm 0,96$  mMTE/g suhe tvari



### 3.5. Ukupna antioksidativna aktivnost ABTS metodom

Slika prikazuje masenu koncentraciju antioksidativne aktivnosti dobivene ABTS metodom (mg TE /g suhe tvari) u vodenim ekstraktima cjelovitog (A), grubo mljevenog B) i sitno mljevenog (C) lišća istarskih sorti maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (IB). Rezultati su srednje vrijednosti 3 paralelna određivanja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistički značajna razlika (\*) određena je Tuckey testom (T) ili Kruskal-Wallis testom (KW) na razini značajnosti  $p < 0,05$ .



Slika 25. Ukupna antioksidativna aktivnost dobivena ABTS metodomu infuzijama lišća maslina Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska Bjelica (I Bjelica, IB).

U ovom istraživanju rezultati pokazuju da vrijeme nema veliki utjecaj na antioksidativnu aktivnost dobivenu ovom metodom. Pri vremenu od 5 minuta u cijelim listovima Rosinjola je imala aktivnost od  $35,16 \pm 1,05$  mg TE/g suhe tvari, Buža  $29,48 \pm 2,17$  mg TE/g suhe tvari, a Istarska Bjelica  $27,87 \pm 1,41$  mg TE/g suhe tvari. U vremenu od 30 minuta Rosinjola je imala aktivnost od  $32,18 \pm 2,33$  mg TE/g suhe tvari, Buža  $29,44 \pm 2,60$  mg TE/g suhe tvari, a Istarska Bjelica  $27,39 \pm 1,31$  mg TE /g suhe tvari.

Pokazalo se da su usitnjeni listovi imali najveću antioksidativnu aktivnost, te time možemo zaključiti da što su listovi usitnjeniji, veća je i antioksidativna aktivnost.

## 4. Rasprava

U ovom istraživanju može se primijetiti kako je koncentracija ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoidnih fenola bila najveća pri vremenu od 30 minuta, a najmanja u vremenu od 5 minuta. Iz toga možemo zaključiti da što je više vremena prošlo pokazala se i veća koncentracija fenola. U istraživanju antioksidacijske aktivnosti medicinskih biljaka (lišće kupine, masline, melise, timijana, lavande i koprive) (Komes i sur., 2010) došlo se do istog zaključka, koncentracija je bila veća što je vrijeme ekstrakcije bilo dulje.

Rusak i sur. (2008) istraživali su antioksidacijsku aktivnost zelenog i bijelog čaja u vremenu od 5, 15, i 30 minuta, te se pokazalo kako je zeleni čaj imao više ukupnih fenola (759 – 2377 mg/L galne kiseline) od bijelog čaja (423-2141 mg/L galne kiseline). Autori citiranog rada zaključili su da je ekstrakcija ukupnih fenola i flavonoida puno sporija kod bijelog čaja. U ovom radu također je pokazano da su koncentracije ekstrahiranih fenola i flavonoida bile najveće u vremenu od 30 minuta

U istraživanju lišća dalmatinskih sorti maslina (Marić, 2013.) ukupna koncentracija fenola u infuzijama varirala je od 52,62 – 72,20 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhe tvari. Najveću ukupnu koncentraciju fenola imao je kultivar Oblica sa 72,20 mg GAE/g suhe tvari, a najmanju kultivar Lastovka.

U ovom istraživanju najveću koncentraciju fenola imala je sorta Buža. U vremenu od 30 minuta koncentracija fenola bila je 30,275 mg galne kiseline / g suhe tvari, dok je najmanju koncentraciju imala sorta Istarska Bjelica koja je u vremenu od 5 minuta imala koncentraciju od 0,450 mg galne kiseline/g suhe tvari. Po ovim podacima možemo primjetiti kako Rosinjola, Buža i Istarska Bjelica imaju manju koncentraciju fenola i od sorte Lastovka (Marić, 2013.) koja je imala najmanju koncentraciju od čak pet sorti maslina. Također, Molina Alcaide i Nefzaoui (1996) dokazali su da koncentracija ukupnih fenola u svježim listovima maslina varira ovisno o sorti masline. Sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktu mijenja se ovisno o metodama ekstrakcije i pripremi biljnog materijala. Ukupna koncentracija fenola razlikuje se u suhim i svježim listovima maslina, što pokazuje da sušenje ima značajan utjecaj. Ukupna koncentracija fenola suhih listova maslina je veća u odnosu na svježe (Boudhrioua i sur., 2009).

Pokazale su se razlike između cjelovitih listova sve tri sorte. Najveću koncentraciju imala je sorta Rosinjola, a najmanju Istarska Bjelica. Ukupni rezultati pokazuju da je pri koncentraciji ukupnih fenola kod cjelovitih listova bilo veoma bitno vrijeme te je koncentracija bila najveća pri vremenu od 30 minuta. Iz ovih rezultata se može zaključiti da je usitnjenost listova vrlo bitna te što su listovi bili sitniji, bila je i veća koncentracija fenola, flavonoida i neflavonoidnih fenola. Na primjer rezultati ukupnih flavonoida sorte Buže pokazuju da je kod usitnjenih listova u vremenu od 5 min koncentracija iznosila  $0,78 \pm 0,11$  mg CE/ g suhe tvari, a u vremenu od 30 minuta je koncentracija iznosila  $25,17 \pm 2,33$  mg CE/ g suhe tvari. Kod grubo usitnjenih listova najveću koncentraciju pri vremenu od 5 minuta ima Rosinjola s 3,66 mg GAE/g suhe tvari. Pri vremenu od 15 minuta najveću ima Istarska Bjelica s 4,47 mg GAE/g suhe tvari, a u vremenu od 30 minuta Buža je sorta s najvećom koncentracijom ukupnih neflavonoida.

Kod usitnjenih listova može se primijetiti kako u vremenu od 5 minuta koncentracija neflavonoida je približno jednaka za sve sorte. U vremenu od 15 minuta Rosinjola je sorta s najvećom, a Buža s najmanjom koncentracijom. U vremenu od 30 minuta Buža ima najveću koncentraciju neflavonoida s 18,90 mg GAE/g suhe tvari te je to i najveća koncentracija neflavonoida u ovom istraživanju.

Koncentracija flavonoida u ovom istraživanju ovisila je i o usitnjenosti listova te se na grafovima može vidjeti kako se najveća koncentracija dobila upravo kod usitnjenih listova. Najveću koncentraciju imala je Istarska Bjelica fino samljevena u vremenu od 30 minuta te je njezina koncentracija iznosila 30,33 mg CE/g suhe tvari. Može se zaključiti da su koncentracije bile najmanje u vremenu od 5, a najveće u vremenu od 30 minuta. Ukupno gledajući rezultate i ovdje se može vidjeti kako je koncentracija ukupnih neflavonoida najmanja pri vremenu od 5 minuta te se postupno povećava. Gledajući na veličinu listova može se vidjeti kako je koncentracija najmanja kod cjelovitih, a najveća kod fino usitnjenih listova.

Poljuha i sur. (2015) istraživali su koncentraciju fenola, flavonoida i neflavonoida te antioksidacijsku aktivnost divlje šparoge, bodljikave veprine i kuke. U svom istraživanju došli su do zaključka da kuka ima najviše fenola s 1343 mg GAE/ 100 g suhe tvari, šparoga ima 793 mg GAE/ 100 g suhe tvari, a najmanje ima bodljikava veprina 617 mg GAE/ 100 g suhe tvari. Navedene tri biljke su prelivene sa 100 ml

vruće vode i vrijeme ekstrakcije je bilo 5 minuta. Ove rezultate možemo usporediti s rezultatima iz ovog istraživanja te zaključiti kako masline u vremenu od 5 minuta ipak imaju više fenola, flavonoida i neflavonoida nego navedene tri biljke.

Na slici 24. možemo vidjeti koncentracije dobivene FRAP metodom te zaključiti da kada je riječ o cjelovitim listovima sve sorte imaju podjednaku koncentraciju. Pri vremenu od 5 minuta Rosinjola i Buža su imale približnu dok je Istarska Bjelica imala najmanju koncentraciju koja je iznosila 0,186264mM TE/g suhe tvari/g suhe tvari. Gledajući pri vremenu od 15 minuta Rosinjola se pokazala kao sorta s najvećom koncentracijom od 0,717191675mM TE/g suhe tvari, dok je Buža imala najmanju sa 0,29501524mM TE/g suhe tvari. U vremenu od 30 minuta Buža je imala najveću, a Rosinjola najmanju koncentraciju. Kod grubo usitnjenih listova pri vremenu od 15 i 30 minuta Istarska Bjelica je imala najveću koncentraciju dok je Buža imala najmanju. Kod usitnjenih listova pri vremenu od 5 minuta ne vide se značajnije razlike i odstupanja, ali je pri vremenu od 15 minuta se pokazalo da Rosinjola ima najveću koncentraciju od 20,1732072mM TE/g suhe tvari, a u vremenu od 30 minuta to je imala Istarska Bjelica sa 23,68797474mM TE/g suhe tvari.

Na slici 25. pri mjerenju ukupnih antioksidativnih tvari ABTS metodom došli smo do rezultata da kod cjelovitih i grubo mljevenih listova u vremenu od 5, 15 i 30 minuta najveću koncentraciju imala je Rosinjola, a najmanju Istarska Bjelica. Koncentracije kod cjelovitih listova su bile u rasponu od 27,390 do 35,163 mg TE /g suhe tvari, kod grubo mljevenih u rasponu od 31,36567053 do 41,28783582mg TE /g suhe tvari, a kod fino usitnjenih raspon je bio od 0 do 48,46232498mg TE /g suhe tvari. Kod usitnjenih listova nema značajnijih razlika u vremenu od 5 i 15 minuta dok smo u vremenu od 30 minuta rezultate dobili samo za Istarsku Bjelicu. Pri ekstrakciji ABTS metodom, vremensko trajanje ekstrakcije pokazuje vrlo mali utjecaj na rezultat., ali je koncentracija bila malo veća kod usitnjenijih listova nego kod cjelovitih. Ovom metodom dobiveni su približni rezultati među sortama iako se Rosinjola malo istaknula prema dobivenim podacima.

Ova tema može poslužiti da se osvrnemo na sadržaje iz prirode i društva od 1.-4. razreda osnovne škole. Mnogi učitelji i učiteljice ponekad nemaju vremena ili ideja kako neke stvari iskoristiti u nastavi stoga ću proći prema planu i programu te napisati kako bi se tema ovog rada mogla iskoristiti u razrednoj nastavi. Cilj nastave

prirode i društva je doživjeti i osvijestiti raznolikost i složenost različitih čimbenika koji nas okružuju.

U prvom razredu kada se obrađuje cjelina *Život u obitelji* ukoliko netko od učenika ima roditelje koji se bave maslinarstvom mogu ispričati kako izgleda drvo masline, kako se uzgajaju ili beru te ispričati sve što znaju o maslinarstvu. Prilikom obrade cjeline *Priroda se mijenja (godišnja doba)* možemo učenicima na primjeru masline pokazati kako maslina izgleda u jesen, zimu, ljeto i proljeće.

U drugom razredu kada se obrađuje tema *Moj zavičaj i Izgled zavičaja* ukoliko učenici žive na području gdje se masline uzgajaju učitelji mogu ispričati zašto se masline uzgajaju samo u tom području te objasniti što je sve potrebno kako bi se posadile masline. Učenike se može odvesti na izlet te ih upoznati s osobom koja se bavi maslinarstvom koja im može pokazati nasade maslina, različite sorte te pokazati ili objasniti kako izgleda proizvodnja maslinovog ulja. Učenicima bi bilo dobro da se detaljnije upoznaju s izgledom masline i njezinom posebnosti.

Kod cjeline *Pokus* učenicima se mogu izvoditi slični pokusi kao i u ovom radu. Učitelji mogu donijeti nekoliko čaša i dvije sorte maslina te u vrućoj vodi najprije 5 minuta držati listove maslina pa s učenicima vidjeti ima li razlike između sorti. Zatim to isto napraviti u 15 minuta. Učenike se može pitati koje razlike vide u vremenu od 5 minuta i 15 minuta.

Prilikom obrade teme *Moj zavičaj u prošlosti* učenike se može upoznati s alatima koja su se u prošlosti koristila za obradu maslina te im donijeti enciklopedije u kojima mogu pročitati i vidjeti fotografije iz prošlosti. Isto tako učitelji mogu ispričati zanimljivosti vezane uz stablo masline te što je maslina značila u prošlosti.

U trećem razredu prilikom obrade cjeline *Život biljke* na primjeru masline učenicima se može objasniti kako maslinu treba njegovati te ponoviti njezine dijelove, što joj je potrebno kako bi se razvila, postoje li neki nametnici koji smetaju maslini i slično.

Kroz sve razrede moguće je učenicima približiti maslinu kao i sve druge biljke. Ukoliko su učenici u zavičaju u kojem se masline uzgajaju vrlo je važno upoznati ih s biljkama specifičnim za njihovo podneblje. Svakako je najbolje ako su učitelji u mogućnosti odvesti ih na neki kratki izlet gdje oni mogu vidjeti i dodirnuti tu maslinu te čuti od profesionalaca ponešto o toj biljci.

Ukoliko su učenici izvan tog zavičaja svakako se mogu fotografijom ili filmom približiti ta svojstva masline.

## 5. Zaključak

U istraživanju provedenom u laboratoriju Metris u Puli određene su kvantitativne vrijednosti biološki aktivnih tvari u lišću triju istarskih sortama maslina: Rosinjola, Buža i Istarska Bjelica.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da najveću koncentraciju ukupnih fenola sadrži sorta Rosinjola. Istarska Bjelica, bez obzira na vrijeme ekstrakcije ima najveću koncentraciju flavonoida i najmanju koncentraciju neflavonoidnih fenola, dok su Rosinjola i Buža pokazale veliku koncentraciju ukupnih neflavonoida,.

Kod rezultata dobivenih FRAP metodom nijedna od sorta ne prevladava. Ovisno o vremenu i načinu mljevenja lista, svaka od sorti je pokazala veliku koncentraciju antioksidativne aktivnosti u jednom pogledu. Kod cjelovitih listova prevladavaju Buža i Rosinjola, kod grubo mljevenih listova prevladavaju Rosinjola i Istarska Bjelica, dok kod usitnjenih listova najveću koncentraciju imaju Rosinjola i Istarska Bjelica. Kod rezultata provedenih ABTS metodom kod cjelovitih i grubo usitnjenih listova najveću koncentraciju ima sorta Rosinjola.

Iz ovih rezultata i mjerenja možemo potvrditi da gradacija lista ima veliki utjecaj na antioksidativni kapacitet infuzija. Također, potvrđeno je da ukupni fenoli i ukupni neflavonoidi imaju veliki utjecaj na antioksidativni kapacitetu svim sortama maslina. Od ove tri sorte maslina preporučila bih Rosinjolu jer je na temelju naših rezultata ta sorta pokazala da ima najveće koncentracije fenola, flavonoida i neflavonoida u većini slučajeva. Isto tako vrijeme ekstrakcije je vrlo važno jer su se u vremenu od 30 minuta pokazale najveće koncentracije fenola.



## 6. Literatura

ATOUI, A., et al. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chem.* 89. Str. 27-36

BENZIE, I. F., STRAIN, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of “antioxidant power”: The Frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239, str.70–76.

BOUDHRIOUA, N., BAHLOUL, N., SLIMEN, IB., KECHAOU, N. (2009.) Comparison of the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products* 29. str. 412–419.

BRAHMI, F., MECHRI, B., DABBOU, S., DHIBI, M., HAMMAMI, M., (2012). The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products* 38, str. 146-152.

BRAVO, L., (1998.) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *PubMed*. 56 (11). str. 317.333.

DEL FABRO, A. (2015.) *Maslina uzgoj, berba i korištenje*. Rijeka: Leo Commerce d.o.o.

DRUŽETIĆ, E. (2014.) *Maslinarski priručnik*. Split: Slobodna Dalmacija d.d.

KOMES, D. i sur. (2010) Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Traditionally Used Medicinal Plants Affected by the Extraction Time and Hydrolysis. *Phytochem. Anal.* 22. str. 172-180.

MARIĆ, S. (2013). Ukupna antioksidativna aktivnost u listovima četiri autohtona kultivara maslina. *Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku*.

MILJKOVIĆ, I. i SUR. (2011.) *Maslina i maslinovo ulje*. Zagreb:“Mavi“ d.o.o.

MOLINA ALCAIDE, E., NEFZAOU, A. (1996): Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *Int Biodeterior Biodegrad.* 96. Str. 227–235.

MUJIĆ, I. et al. (2011.): Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract as a Source of Useful Antioxidants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition.* 6. (3-4).str.129-133.

NACZK, M., & SHAHIDI, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41. str. 1523–1542.

OUGH, C.S., AMERINE, M.A. (1988.) *Methods Analysis of Musts and Wines.* 2. izdanje., Johan Wiley & sons, New York.

P. KAZAŽIĆ, S. (2004.) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol.* 55. str.279-290.

POLJUHA, D. et al. (2015). Phenolic composition, antioxidant capacity, energy content and gastrointestinal stability of Croatian wild edible plants. *Eur Food Res Technol.*

RE, R. et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26. (9/10), 1231–1237.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J. I PAGANGA G. (1996.) Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radical Biol. Med.*, 20 (7.) str. 933–956.

ROBARDS, K., PRENZLER, P.D., TUCKER, G., SWATSITANG, P., GLOVER, W. (1999.) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, str. 401-436.

RUSAK, G., et al. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food chemistry.* 110, str. 852-858.

SEDEF, N., KARAKAYA, S. (2009): Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*. 67, str. 632-638.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299, str. 152-178.

STRELEC, KOVAČ (2013.) *Praktikum iz biokemije*. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

ŠILOVIĆ, MERI. (2012.) *Masline i vina s Jadrana*. Split. Slobodna Dalmacija

VEČERNIK, N. (2003.) *Čovjek i maslina*. III. Dopunjeno izdanje. Split: Grafex d.o.o.

VISCHIOT, S. (2004.) *Maslinarstvo u vrtu i voćnjaku*. Zagreb:Leo Commerce d.o.o.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W. (1999) Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chemistry*, 64, str. 555-559.

ŽUŽIĆ, I. (2008.) *Maslina i maslinovo ulje*. Velika Gorica:

United States Department of Agriculture

<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2283?fgcd=&man=&lfacet=&count=&max=35&sort=&qlookup=olive&offset=&format=Abridged&new=&measureby=>

(pristupljeno 25.06.2016.)

Laboratorij za oksidacijski stres

<http://www.irb.hr/Istrazivanja/Zavodi/Zavod-za-molekularnu-medicinu/Laboratorij-za-oksidacijski-stres> (pristupljeno 06.10.2016.)

Struna

<http://struna.ihj.hr/naziv/apsorbancija/10491/> (pristupljeno 22.10.2016.)

Izvor slika

Slika 1.- 8. (Šilović, 2012)

Slika 9. <http://www.wikiwand.com/sr/Katehin>

Slika 10. <http://www.wikiwand.com/bs/Tanin>

Slika 11.

[https://bib.irb.hr/datoteka/773932.5.11.2015.FG\\_102015\\_Znanstveni\\_rad.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/773932.5.11.2015.FG_102015_Znanstveni_rad.pdf)

Slika 12. –25.. Vlastiti izvor

## Sažetak

Biološki aktivne tvari mogu se definirati kao prirodni nenutritivni fiziološki aktivni sastojci hrane koji imaju određena funkcionalna svojstva u organizmu te djeluju kao pomoćna sredstva u sprječavanju i liječenju bolesti te poboljšavanju stanja organizma. Ukupni antioksidativni kapacitet hrane pokazuje koliko antioksidansi (prethodno analizirane biološki aktivne tvari poput fenola) u nekoj hrani mogu uništiti slobodnih radikala.

Cilj ovog istraživanja bio je određivanje bioaktivnih tvari i ukupnog antioksidativnog kapaciteta biljnih infuzija tri različite sorte istarskih maslina: Rosinjola, Buža i Istarska Bjelica. U istraživanju su korišteni listovi maslina ubrani u srpnju 2015. godine na području Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču. Koristeći kolorimetrijske i spektrofotometrijske metode određivanja ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoidnih fenola, kao i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (ABTS i FRAP metodama) praćen je utjecaj gradacije listova (fino mljeveni, grubo mljeveni i cijeli) te utjecaj vremena (5 minuta, 15 minuta i 30 minuta) na rezultat ekstrakcije. Sva laboratorijska mjerenja obavljena su u Centru za istraživanje materijala Istarske županije. Rezultati provedenih mjerenja izraženi su kao prosječne vrijednosti triju mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Dobiveni rezultati pokazuju da gradacija lista ima veliki utjecaj na antioksidativni kapacitet infuzija pri čemu fino mljeveni listovi pokazuju najveću količinu ekstrahiranih tvari. Slično tome, i vrijeme ekstrakcije je vrlo važno jer su se u vremenu od 30 minuta pokazale najveće koncentracije fenola. Također, potvrđeno je da ukupni fenoli i ukupni neflavonoidi imaju veliki utjecaj na antioksidativni kapacitet sve tri sorte maslina. Od ove tri sorte maslina preporučila bih Rosinjolu jer je na temelju naših rezultata pokazala najveće koncentracije fenola, flavonoida i neflavonoida.

## Summary

The biologically active agents may be defined as a natural unnutritious physiological active ingredients which have specific functional properties in the organism. They act as adjuvants in preventing and treating diseases, thus improving the state of the organism. The total antioxidant capacity of food shows how antioxidants (previously analyzed biologically active agents such as phenol) can destroy free radicals in certain food.

The aim of this study was to determine the bioactive substances of antioxidant capacity of the plant infusions in three different varieties of the Istrian olive. This study used leaves of Istrian olive varieties: Rosinjola, Buža and Istarska Bjelica. Leaves were harvested in July 2015 in the area of Agricultural Institute Poreč. All measurements were performed in the laboratory. Using colorimetric and spectrophotometric methods for determination of total phenols, flavonoids and nonflavonoid phenols and total antioxidant capacity (ABTS and FRAP methods) is followed by the impact of gradation on leaves (finely ground, rough ground and whole) and the effect of time (5 minutes, 15 minutes and 30 minutes) on the result of extraction. All laboratory measurements were performed at the Center for Materials Research in the Istrian County. The results of the measurements are expressed as average values of three measurements with the corresponding standard deviations.

The obtained results show that the gradation of a leaf has a major impact on the antioxidant capacity of infusion with finely ground leaves showing the greatest amount of extracted substances. Similarly, the extraction time is also very important because the highest concentration of phenols was achieved in a time of 30 minutes. It was also confirmed that the total phenols and total nonflavonoids have a major impact on the antioxidant capacity of all three varieties of olives. Of the three varieties of olives I would recommend Rosinjola because on the basis of our results it showed the highest concentrations of phenols, flavonoids and nonflavonoids.